

29. Ciencia, Tecnología, e Innovación

Estandarización de dos PCR multiplex como base de un Test de genotipado para Pejerrey (*Odontesthes bonariensis*).

Sapino, Román; Arranz Silvia E; Diaz, Juan; Faggiani, Mariano; Villanova, Gabriela V.

*rsapino@fbioyf.unr.edu.ar

Laboratorio de Biotecnología Acuática (FCByF UNR - Min. CTelP Sta Fe)
Acuario del Rio Paraná

Resumen

El pejerrey bonaerense es una especie de gran importancia económica en Argentina. La piscicultura de pejerrey data de varias décadas en las que se ha poblado o repoblado ambientes con larvas. A pesar de la importancia de esta especie, la información sobre la diversidad genética de sus poblaciones, que sirva para la mejora de su producción o para la mitigación del impacto de las resiembras, es escasa. En este trabajo se propone el desarrollo de un test de genotipado basado en dos reacciones de PCR multiplex utilizando marcadores microsatélites. Se seleccionaron 13 marcadores descritos en la bibliografía que fueron estandarizados. Luego, los marcadores se evaluaron en una población silvestre (n=20). Se extrajo el ADN a partir de tejido de cada individuo y se amplificó por PCR los 13 marcadores microsatélites. Los productos de amplificación fueron resueltos en geles de poliacrilamida teñidos con plata. Para cada individuo se obtuvo un genotipo. Para cada locus, se determinó el número de alelos, heterocigocidad observada y esperada, frecuencia de alelos nulos, contenidos de información polimórfica (PIC), y probabilidad de exclusión. Teniendo en cuenta estos parámetros, se seleccionaron 7 loci que fueron combinados en dos PCR multiplex M1 y M2 de acuerdo a los tamaños de los fragmentos que produce su amplificación. Los cebadores se marcaron fluorescentemente, y se estandarizaron las condiciones para M1 y M2. Las amplificaciones se evaluaron por electroforesis capilar. Dichas multiplex constituyen la base del Test de genotipado y grado de parentesco para pejerrey. Esta herramienta permitirá evaluar la diversidad genética y el grado de parentesco existente entre los reproductores de los centros de cultivo evitando la depresión consanguínea.

Palabras clave: Microsatélites, Pejerrey, Piscicultura, Genética.

Introducción

El pejerrey bonaerense (*Odontesthes bonariensis*) es un pez nativo que habita diferentes ambientes de aguas continentales, tales como estuarios, lagunas y ríos de Argentina, Chile, Uruguay y Perú. También ha sido introducido en países de otros continentes como por ejemplo Italia y Japón. Perteneció a la Familia Atherinopsidae, Orden Atheriniformes, Superorden Acanthopterygii. En Argentina, el pejerrey es la especie emblemática de las pesquerías recreativas y deportivas. Su dispersión, a través de siembras y resiembras, se realiza desde hace más de un siglo. La especie se adapta a amplios rangos de pH, salinidad y temperaturas. Hasta el momento el cultivo intensivo de pejerrey no es rentable económicamente debido a su baja tasa de crecimiento. En los últimos años se ha avanzado en la obtención alevinos en sistemas cerrados (Miranda et al. 2006), la optimización de su cría en cautiverio y el conocimiento de la endocrinología del crecimiento (Arranz et al. 2008). La piscicultura del pejerrey continúa limitándose a poblar y repoblar ambientes con larvas o alevinos. Su pesca, moviliza a más de 5 millones de pescadores recreativos en nuestro país y representa un movimiento económico de más de U\$S 2.000 millones anuales en la provincia de Buenos Aires. La producción

de ovas y alevinos de pejerrey para siembra comprendieron más de 173 millones de unidades en los últimos 10 años, y ha sido realizada principalmente por la estación hidrobiológica de Chascomús (MinAgr., Gobierno de la Provincia de Bs. As.).

Por otra parte, la información sobre la diversidad genética de las poblaciones silvestres y de cultivo que sirva de base para la mitigación del impacto de las resiembras es escasa. Según Cruzan (2001), el nivel de diversidad genética es un indicador de la vitalidad general de una especie y su potencial para la respuesta evolutiva a los cambios ambientales. Se espera que los peces de agua dulce tengan altos niveles de diversidad genética debido a la fragmentación natural de los ríos y lagos. Sin embargo, las introducciones intencionales para la pesca, la acuicultura y repoblar los sistemas de agua dulce, en la mitigación de las reducciones de la población, puede homogeneizar las poblaciones. Olden et al. (2004) sugirieron que las alteraciones antrópicas y la dispersión asistida han producido la homogeneización genética y reducido el componente espacial de la variabilidad genética en especies o entre sus poblaciones. A través de estudios de diversidad genética se demostró homogeneización genética en *O. bonariensis* entre sitios afectados por la

pesca comercial y deportiva, producto de la introducción de individuos de otros sitios (Valencia, 2017). Además, se observó menor diversidad genética en una población de cultivo de Argentina, respecto de una población silvestre (Villanova et al. 2013). Sumado a esto, el desarrollo de la piscicultura sostenible requiere de la evaluación de la diversidad genética presente en las poblaciones naturales. Esta información es necesaria para ser tomada como parámetro para ser comparada con la diversidad genética presente en los stocks de reproductores mantenidos en cautiverio, permitiendo organizar la manera en que se llevan a cabo las cruces, procurando disminuir al mínimo la endogamia.

Una de las herramientas moleculares más utilizadas para estimar la diversidad genética de las poblaciones de peces son los marcadores moleculares microsatélites. El desarrollo de microsatélites para especies con importancia en acuicultura ha crecido enormemente en los últimos años dada su utilidad para la identificación y diferenciación de especies, poblaciones y stocks, estudios de variación genética y estructura demográfica de las poblaciones naturales, control de endogamia y grado de parentesco, evaluación de cuellos de botella demográficos en poblaciones naturales, propagación asistida en programas de repoblamiento, y mapas de ligamiento o programas de selección

genética asistida por marcadores (revisado por Chistiakov et al. 2006).

La utilización de PCR multiplex, donde dos o más loci son amplificados simultáneamente en la misma reacción, disminuye el número de reacciones por experimento, la cantidad de reactivos y también la cantidad de ADN. Además, reduce el tiempo y los errores asociados, y es una técnica poderosa que puede aumentar la productividad de los estudios genéticos. En la bibliografía, se encuentran disponibles 49 marcadores microsatélites descritos para *O. bonariensis* (Beheregaray y Sunnucks 2000, Koshimizu et al. 2009, Villanova et al. 2013), que podrían ser utilizados para el estudio de genética de poblaciones de pejerrey.

Conocer la diversidad genética y la estructura genética en el área nativa del pejerrey argentino es fundamental para reconocer el efecto de las acciones humanas en su conectividad ecológica y las posibles consecuencias (como la homogeneización y, por lo tanto, reducción del componente espacial de la variación genética) con el fin de desarrollar estrategias de conservación (Crook et al., 2015).

Objetivos

Se plantea como objetivo general de este trabajo el desarrollo de un test de genotipado para Pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) formado por 2 reacciones de PCR multiplex, compuestas por hasta 4 marcadores microsatélites cada una.

Para cumplir con lo propuesto se plantean los siguientes objetivos específicos:

1- Estandarizar en el Laboratorio de Biotecnología Acuática marcadores microsatélites previamente descritos en la bibliografía y determinar sus parámetros de polimorfismo.

2- Estandarizar dos reacciones de PCR multiplex utilizando los marcadores seleccionados.

Materiales y Métodos

Material biológico

Se utilizaron muestras de aleta caudal de 20 ejemplares de pejerrey *O. bonariensis*, obtenidos de la laguna de Chacomús (Bs. As.).

Obtención de ADN

La extracción de ADN de alto peso molecular de *O. bonariensis* se realizó de acuerdo al método descrito por Lopera-Barrero (2008). Las muestras de aletas (20 mg) se trataron con 500 μ L de buffer de lisis (50 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM de EDTA; 100 mM de NaCl; 1% de SDS) y 5 μ L de proteinasa K (20 mg/mL). Inmediatamente se incubó a 55°C por 2 h. Se adicionó 5 μ L de RNasa (4mg/mL) y se continuó el tratamiento a 55°C por una hora más. Luego de una centrifugación a 13000 rpm y 4°C durante 15 min en centrífuga Sorvall ST 16R (Thermo Scientific), se trató el sobrenadante con 300 μ L de NaCl 5 M, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 13000 rpm y 4°C durante 15 min recuperando 500 μ L del sobrenadante. A éste se le

agregó 1 mL de etanol absoluto frío y 50 μ L de acetato de sodio 10 M y se lo incubó a -20°C durante 16 h. Las muestras de ADN fueron centrifugadas a 13000 rpm y 4°C durante 15 min. El precipitado se lavó con 750 μ L de etanol 70% y se centrifugó a 13000 rpm y 4°C durante 15 min. Luego de descartar el sobrenadante, el precipitado se secó en una estufa a 37°C. Finalmente el mismo se solubilizó en 100 μ L agua destilada a 55°C por 2h. La integridad del ADN obtenido se estimó en geles de agarosa 1% (p/v) teñidos con Gel-Green (Biotium). Su concentración se midió por espectroscopia de absorción UV-Vis (a 260 nm) en el espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) y se midió la relación de absorbancias 260nm/280nm para verificar la calidad de la extracción. El ADN se conservó a -20°C y se prepararon soluciones de uso a una concentración de 50 ng/ μ L que se mantuvieron a 4°C.

Estandarización de la amplificación por PCR de los loci microsatélites

Se seleccionaron 13 marcadores descritos en la literatura, de acuerdo a sus tamaños y temperaturas de hibridación. Once descritos para *O. bonariensis* por Koshimizu *et al.* (2009) y Villanova *et al.* (2013), Obo02, Obo05, Obo26, Obo46, Obo54, Obo59, Obo71, Obo77 y OdLAR94, OdLAR95, OdLAR96, respectivamente. Y dos descritos para *O. argentinensis* por Beheregaray & Sunnucks (2000), Odont02 y Odont23.

Los distintos *loci* microsatelites fueron amplificados por PCR singleplex, utilizando cebadores no marcados, en un volumen final 20 μ L. Incluyendo, buffer PCR 1X (Invitrogen), $MgCl_2$ 1,5 mM, dNTPs 0,1 mM, 0,2 μ M de cada oligonucleótido cebador, 1 U de Taq ADN Polimerasa (Invitrogen), 50 ng de ADN molde, completando el volumen con agua destilada.

Las amplificaciones se realizaron mediante un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 min, 35 ciclos secuenciales de desnaturalización durante 1 min a 94°C, anillado de 40 s a 60°C y extensión de 40 s a 72°C, y una etapa final de elongación a 72°C por 10 min. La verificación de la amplificación se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 3% (p/v) teñidos con Gel-Green (Biotium).

Caracterización de los loci microsatélites

La evaluación del polimorfismo y la utilidad de los marcadores, se realizó por genotipificación de los individuos mediante electroforesis en geles de poli(acrilamida), en condiciones desnaturalizantes. Se emplearon concentraciones de acrilamida de 7, 8 y 10% (p/v) preparada por disolución en buffer TBE (tris-base 89 mM; ác. bórico 89 mM; EDTA 2 mM; pH 8,3) y suplementada con urea 7 M. Para la preparación de cada gel se utilizaron 60 mL de la mezcla, que se polimerizó utilizando 100 μ L de APS al 25% (p/v) y 50 μ L de TEMED. Los geles fueron

armados utilizando el sistema Sequi-Gen GT System (Bio-Rad). Al vidrio de soporte del gel se lo trató con 3 μ L del agente silanzante *Bind Silane* (Sigma-Aldrich), mezclado con 5 μ L ácido acético 0,5% (v/v) y 950 μ L de etanol 96%. El vidrio corto se trató con 2 mL de *Repel Silane* (Sigma-Aldrich). Se realizó una pre-corrída electroforética en una solución TBE 0,5X aplicando una potencia de 55 W hasta llegar a una temperatura estable de 50°C durante una hora. Luego se procedió a sembrar las muestras, que previamente se mezclaron en partes iguales con una solución de siembra 2X (azul de bromofenol 0,1% (p/v); xilencianol 0,1% (p/v); 10 mM EDTA, pH 8,0, formamida 0,1% (v/v)) y se incubaron a 95°C durante 7 min. Se utilizó un marcador de peso molecular comercial de 10 pb (Invitrogen) y uno de 50 pb (PB-L). La corrida electroforética se realizó a 55 W y 50°C hasta que el marcador de frente xilencianol alcanzó el borde inferior del gel. Luego de la corrida electroforética se realizó una tinción con sales de plata de acuerdo al método descrito por Bassam (1991).

La asignación de alelos para cada individuo, de acuerdo al tamaño de los fragmentos, se realizó con el programa GelAnalyzer 2010^a.

Los estimadores de diversidad genética utilizados, como el número de alelos (N_a), la heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e), contenido polimórfico (PIC), la frecuencia de alelos

nulos (Fnull) y las probabilidades de exclusión (Excl1 y Excl2) fueron estimados utilizando el programa Cervus v.3.0.7.

Estandarización de reacciones de PCR multiplex

Para la amplificación simultánea de varios microsatélites se realizaron dos reacciones multiplex denominadas M1 y M2 utilizando el kit comercial QIAGEN Multiplex PCR (QIAGEN). El cebador forward de cada par fue marcado fluorescentemente en el extremo 5' del oligonucleótido. Los fluoróforos utilizados fueron: VIC, NED, PET y FAM. En la reacción M1 se amplificaron conjuntamente los marcadores Obo02, Obo26, Obo59 y Odont02. En la reacción M2 se amplificaron los marcadores Obo54, Obo71 y OdLAR95.

Las condiciones de reacción de PCR para M1 y M2 fueron, QIAGEN multiplex PCR master mix 1X; 0,2 μ M de cada cebador; 50 ng de ADN molde y se completó con agua destilada para un volumen final de 15 μ L. Las amplificaciones se realizaron mediante las mismas condiciones descritas para las reacciones de PCR Singleplex.

Los distintos fragmentos microsatélites amplificados en cada multiplex fueron analizados inicialmente por electroforesis en geles de agarosa al 3% (p/v) y luego por electroforesis capilar utilizando el servicio de MacroGen Inc (Seoul, Corea). La asignación de alelos para cada individuo, de acuerdo al tamaño de los

fragmentos se realizó con el programa Peak Scanner (Applied Biosystems).

Resultados

Selección de los marcadores microsatélites a utilizar.

Teniendo en cuenta el objetivo planteado, de desarrollar dos reacciones multiplex, se seleccionaron 13 marcadores microsatélites informados en la literatura (Tabla 1). El criterio utilizado para la selección fue: que la temperatura de anillado sea similar y que los tamaños de los fragmentos de amplificación estén entre 100 y 300 pb. Siendo este un requisito para que tengan eficiencias de amplificación similares.

Estandarización de las condiciones de amplificación para cada marcador.

La estandarización del protocolo del PCR consiste en definir las condiciones óptimas de amplificación para cada par de cebadores. Entre los parámetros a evaluar se encuentran, temperatura de hibridación (T_a), concentración de ADN, concentración de cebadores y concentración de $MgCl_2$. Además, se evalúa también el número de ciclos de la reacción de PCR.

Se analizó la amplificación de los 13 marcadores seleccionados, en dos muestras de la población natural. Se observó amplificación de todos ellos, con excepción del marcador Odont23 en el cual no se observó presencia de bandas, por lo que fue descartado para estudios posteriores. En el caso de los marcadores Obo26 y Obo59, se disminuyó la

concentración de $MgCl_2$ (1 mM) y se aumentó la cantidad de ciclos de reacción (37 ciclos), de modo de lograr mayor especificidad y mayor cantidad de producto de amplificación.

Una vez logradas las condiciones de amplificación para cada marcador, las mismas se utilizaron para la amplificación de los microsatélites en todos los individuos de la población (n=20).

Genotipificación de individuos por electroforesis de ADN en geles de poliacrilamida

Los productos de PCR obtenidos para cada muestra con cada par de cebadores, se separaron y visualizaron en geles de poliacrilamida al 7, 8 y 10% (p/V) en

condiciones desnaturalizantes y se tiñeron con sales de plata. Se obtuvieron imágenes de los mismos, que fueron analizadas con el programa GelAnalyzer 2010^a, para estimar los tamaños moleculares de los microsatélites amplificados. En el caso del marcador OdLAR94, presento bandas muy tenues que imposibilitaron la asignación de alelos a cada individuo, a la vez que, se observó poco polimorfismo, por lo que fue descartado para análisis posteriores.

Análisis de parámetros de diversidad genética

Una vez recopilados los genotipos de cada individuo de la población natural (n=20) se realizó el estudio de los

Locus	Secuencia del cebador (5' - 3')	Motivo	Ta (°C)	Tamaño (pb)
Obo02	F:TTAGTTTTGGGTTTGGATTGG R:CTGGAGCATGGTCATAGGGT	(GT)19	60	114-150
Obo05	F:GAAAACAAAGTCCAACAGAGCC R:GAACCTGTCAGCTCCCTCAC	(CA)19	58	98-152
Obo26	F:CACCAGCAGCTGTAACCTCA R:CCAATCCCCTAAAGTGTTC	(CA)5CG(CA)25	60	118-158
Obo59	F:CATTGCCAGGACAAGTTGTG R:CAATGAGTTGAGTGACCAGCA	(GT)17	60	120-148
Obo77	F:TGAATATGCAAAAACAGATGCC R:TTATTTCTACAAATCGGGGG	(CA)4TA(CA)14	58	138-176
Odont02	F:CGGTACCTGATGGTTGGTC R:AACCCTCAACCCGGCGCATC	(GA)22	61	129-191
Odont23	F:TAAGATGGAGGTGCTG R:TTCTCCCCTTCGTCCATAAC	(GA)23	59	108-180
Obo46	F:GCCTCTGAGCAGCTGACTCT R:GCTGCATGTATGCTAAAACCTGC	(GT)14	58	218-248
Obo54	F:GCCTCTGAGCAGCTGACTCT R:GCTGCATGTATGCTAAAACCTGC	(GT)11 GC(GT)9	58	190-238
Obo71	F:CTCCTCCACCTTTTCTCC R:GTTAGGACACCAGAGCCCAA	(CA)20	60	172-222
OdLAR95	F:ACATACGCCAATGGGTCATC R:GGCAAATAAAGCCCTTTC	(AGA)8	60	300
OdLAR96	F:TTGGCAGAAGGGCAATAAAC R:AAGCATCTCCACAGTCACCA	(TCA)7	60	300
OdLAR94	F:GTGATCCAAGAGCGCAGAAC R:CCGGACCCGTTAACATTCTA	(GTT)11	60	300

Tabla 1: Características de los marcadores microsatélites utilizados.

Ta: temperatura de anillado de los cebadores. Pb: pares de bases.

parámetros de diversidad genética utilizando los marcadores Obo02, Obo05, Obo26, Obo46, Obo54, Obo59, Obo71, Obo77, OdLAR95, OdLAR96, y Odont02. Los parámetros analizados fueron el número de alelos (Na), la heterocigosidad observada (Ho), la heterocigosidad esperada (He), el contenido polimórfico (PIC), la frecuencia de alelos nulos (Fnull) y las probabilidades de exclusión de un falso progenitor cuando no se conoce ningún progenitor (Excl1) y cuando se conoce con seguridad un progenitor (Excl2) (Tabla 2).

El conjunto de marcadores microsatélites presentó un promedio de número de alelos por locus de 8,273, oscilando entre 4 (OdLAR96) y 14 (Odont02). La He osciló entre 0,561 (Obo46) y 0,903 (Odont02) con un promedio de 0,8135. El promedio de PIC fue 0,7665, considerándose valores mayores a 0,5 muy informativos. Algunos loci presentaron una alta proporción de alelos nulos (Fnull>0,1). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se ordenaron los *loci* de forma decreciente de He, ya que mayores índices de este parámetro indican un

Locus	Na	Ho	He	PIC	Excl1	Excl2	Fnull
Obo02	7	0,8	0,81	0,758	0,411	0,589	-0,0154
Obo05	10	0,632	0,899	0,863	0,598	0,75	0,1621
Obo26	9	0,889	0,844	0,8	0,484	0,656	-0,0483
Obo59	8	0,842	0,863	0,822	0,516	0,684	-0,0024
Obo77	8	0,765	0,868	0,823	0,514	0,683	0,0454
Odont02	14	0,75	0,903	0,869	0,615	0,762	0,0845
Obo46	5	0,176	0,561	0,514	0,167	0,338	0,5217
Obo54	5	0,8	0,797	0,741	0,382	0,561	-0,0349
Obo71	12	0,6	0,862	0,826	0,534	0,699	0,1787
OdLAR95	9	0,579	0,848	0,804	0,485	0,658	0,181
OdLAR96	4	0	0,692	0,612	0,245	0,403	1,000

Tabla 2. Estimadores de diversidad genética y probabilidades de exclusión para los 11 loci analizados. Na, número de alelos; Ho, heterocigosidad observada; He, heterocigosidad esperada; PIC, contenido polimórfico; Excl1 y Excl2, probabilidades de exclusión tipo 1 y 2, respectivamente; Fnull, frecuencia de alelos nulos.

Locus	Pexc acum1	Pexc acum2
Odont02	0,615	0,762
Obo59	0,815	0,925
Obo26	0,904	0,974
Obo02	0,943	0,989
Obo54	0,965	0,995
OdLAR95	0,982	0,998
Obo71	0,992	0,999

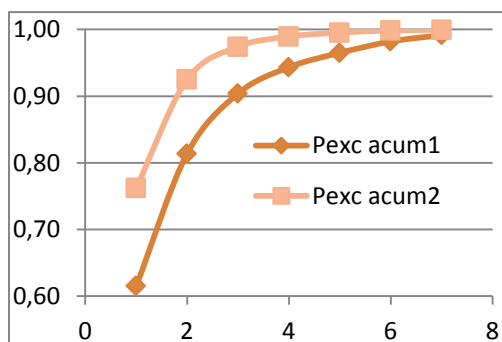


Tabla 3: Probabilidades de exclusión acumulada para los 7 loci seleccionados.

Figura 1: Línea de tendencia de las Pexc acum, con el incremento del número de loci.

mayor polimorfismo y el marcador resulta más informativo. Luego se calcularon los valores de potencial de exclusión acumulados (Pexc acum1 y Pexc acum2) a medida que se retiraban marcadores del análisis, retirando secuencialmente los marcadores que se encontraban últimos en la tabla, hasta llegar a un compromiso entre un alto poder de exclusión (mayor al 95%), con el menor número de marcadores posibles. Además, de utilizar el criterio de contar con una alta He, se seleccionaron *loci* que presentaran una Fnull menor al 10% y la posibilidad de agruparlos en dos reacciones multiplex, según su tamaño y Ta.

En conclusión, se seleccionaron 7 marcadores Obo02, Obo26, Obo59, Odont02, Obo54, Obo71 y OdLAR95. Éstos presentan un potencial de exclusión combinado mayor a 95% (Pexc acum1=0,992) (Tabla 3; Figura 1) y podrían agruparse en dos reacciones multiplex de tamaños de amplificación similares dentro de cada una.

Estandarización de dos reacciones multiplex utilizando los marcadores seleccionados.

Teniendo en cuenta los resultados

obtenidos en la evaluación de los parámetros de diversidad, se procedió a la estandarización de la amplificación de los 7 marcadores, en dos reacciones multiplex, M1 y M2, con 4 y 3 microsatélites respectivamente. En la reacción M1 se agruparon los marcadores Obo02, Obo26, Obo59 y Odont02, mientras que en la reacción M2 se agruparon los marcadores Obo54, Obo71 y OdLAR95. A su vez, se realizó el marcado del cebador forward de cada microsatelite con un fluoróforo diferente dentro de cada multiplex, se tuvo en cuenta los rangos de tamaño de cada marcador, para que no se superpongan los espectros en los electroferogramas al analizar todos los microsatélites en una misma corrida electroforética (Tabla 4).

Para estandarizar las reacciones de amplificación M1 y M2, se evaluaron las condiciones necesarias para la coamplificación. Inicialmente las amplificaciones fueron evaluadas utilizando geles de agarosa al 3% (p/v) luego se utilizó el servicio de secuenciación de fragmentos Macrogen Inc. (Corea) para su estandarización final. Se comenzó realizando amplificaciones

Locus M1	Ta (°C)	Rango de tamaño (pb)	Fluoróforo	Locus M2	Ta (°C)	Rango de tamaño (pb)	Fluoróforo
Obo02	60	108 -150	VIC	Obo54	58	190 - 238	PET
Obo26	60	118 - 158	FAM	Obo71	60	172 - 222	VIC
Obo59	60	120 - 148	PET	OdLAR95	60	291 - 315	NED
Odont02	61	129 - 191	NED				

Tabla 4. Características de los marcadores que componen cada multiplex. Se informa el fluoróforo utilizado en cada caso.

para 3 muestras (CH3, CH4 y CH5), de cada marcador por separado y de manera conjunta en cada multiplex. Con el objetivo de evaluar si se producían cambios en la amplificación al combinarlos.

Mediante la electroforesis en geles de agarosa se observó la presencia de producto de amplificación en todos los casos, tanto en las reacciones de amplificación simple como en las combinadas, y dentro del rango de tamaños moleculares esperados. Sin embargo, debido a la similitud de tamaño de los marcadores no fue posible identificar las bandas correspondientes a cada uno de ellos. Con excepción del marcador OdLAR95, que presenta el mayor tamaño de amplificación en la M2. Además, este marcador presenta una mayor eficiencia de amplificación. Sin embargo, se observa una disminución de su amplificación en las reacciones combinadas, igualándose a la del resto de los marcadores de la M2 (Figura 2).

Posteriormente se realizaron diluciones 1/5 y 1/10 de los productos de amplificación, y fueron analizados mediante electroforesis capilar. Se observó un mejor resultado utilizando las diluciones 1/5. Además se pudo observar eficiencias de amplificación equivalentes para cada marcador en cada una de las multiplex (similares alturas de los picos en los electroferogramas) (Figura 3). Sin embargo, los marcadores de la M1 presentan en conjunto una menor

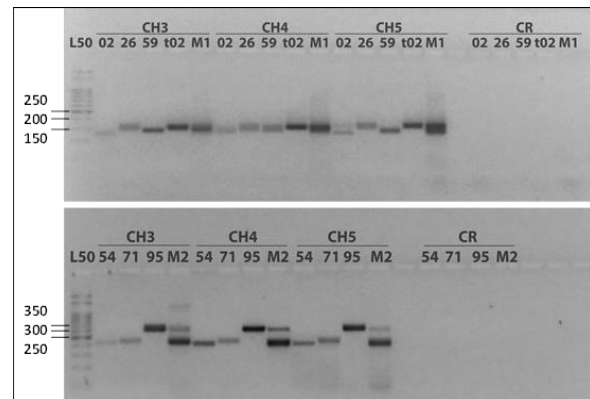


Figura 2. Prueba de amplificación de los marcadores en reacciones singleplex y multiplex. Electroforesis en geles de agarosa al 3% (p/V). Sobre cada calle se indica el marcador amplificado por separado (Obo02, Obo26, Obo59, Odont02 y Obo54, Obo71, OdLAR95) y de manera conjunta M1 y M2, para tres muestras CH3, CH4 y CH5. Además, se indican los controles de reactivos correspondientes. L50: Marcador de peso molecular Ladder 50 pb precisión PB-L, a la izquierda se indica los tamaños (pb) en el rango de amplificación de los marcadores.

eficiencia respecto de los marcadores de la M2. A pesar de esto, se pudo realizar la asignación de alelos para la todas las muestras.

Luego se realizó la amplificación por multiplex de 10 muestras más, (CH1, CH2, CH6, CH7, CH8, CH9, CH10, CH11, CH12 y CH13) en las mismas condiciones, obteniéndose resultados similares.

Discusión

Con el fin de desarrollar un test de genotipado para pejerrey, *O. bonariensis*, debimos evaluar los parámetros de polimorfismo y caracterizar los *loci* microsatélites en una población no estructurada y que ajuste a los parámetros del equilibrio HW. De acuerdo a Villanova, et al (2018) se determinó a la población

de la Laguna de Chascomus (Bs. As), como población natural de referencia.

Se propuso amplificar los loci de manera conjunta en dos reacciones de PCR multiplex, con hasta 4 marcadores cada una. La PCR multiplex permite la reducción del tiempo de laboratorio y el consumo de reactivos costosos, sin comprometer la utilidad del test. Los costos de genotipar usando PCR multiplex son hasta 8 veces menores que usando PCR singleplex (Guichoux E., 2011). Por otra parte, se necesita una cantidad reducida de ADN para determinar el genotipo de un número dado de loci (Karaïskou N, 2008).

Para desarrollar una PCR multiplex es importante validar plenamente los pares

de cebadores a principios del proceso de desarrollo, en forma de singleplex, a fin de evitar la pérdida de tiempo más adelante con cebadores ineficientes o loci no informativos (Guichoux E., 2011). De esta manera, se evaluaron 13 marcadores realizando PCR singleplex a ADN de peces de dicha población. Para la caracterización de los *loci* microsatélites, a través del estudio de parámetros de diversidad genética, se genotiparon los 20 individuos de la población natural mediante asignación de alelos por electroforesis en geles de poliacrilamida. Fueron evaluados 11 marcadores, Obo02, Obo05, Obo26, Obo46, Obo54, Obo59, Obo71, Obo77, OdLAR95, OdLAR96, y Odont02 (Tabla 2). Todos ellos

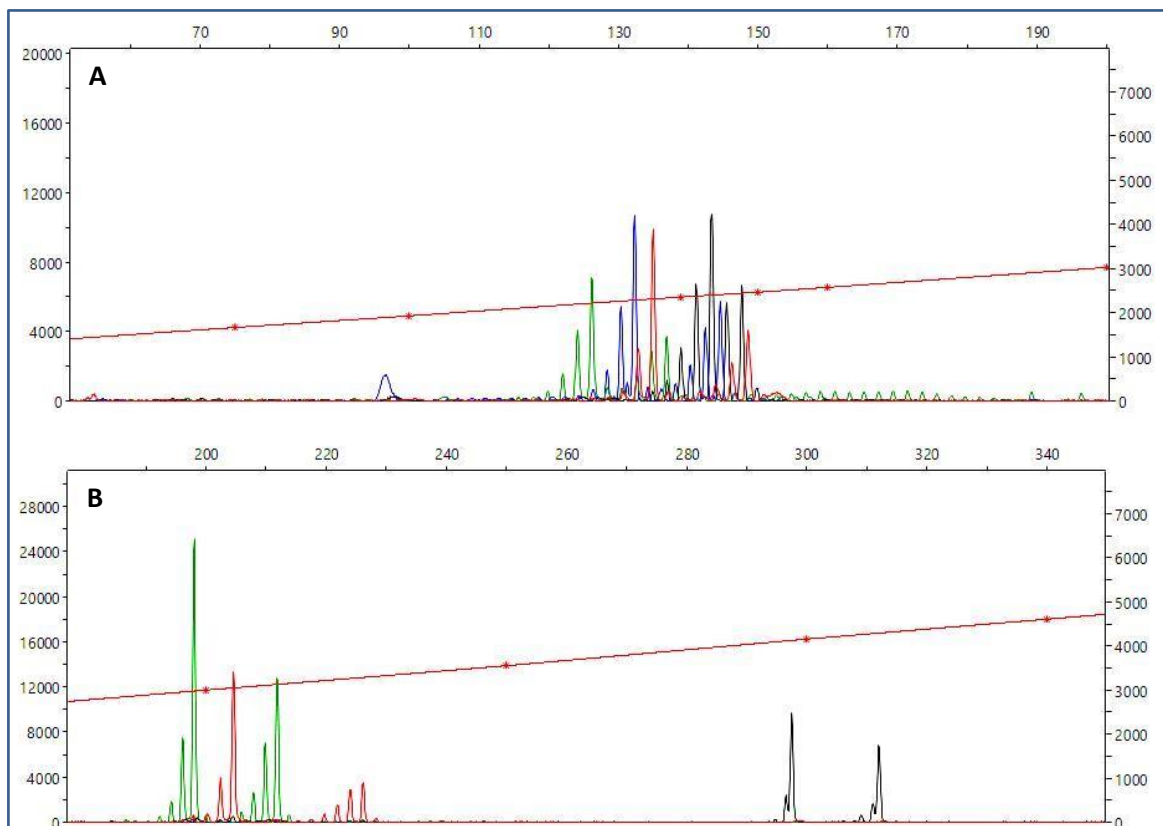


Figura 3. Electroforesis capilar de productos de amplificación de M1 y M2. Electroferogramas: (A) reacción M1 para la muestra CH4. (B) reacción M2 para la muestra CH11. El fluoróforo NED se visualiza en color negro.

presentaron valores de $PIC > 0,5$, indicando un alto nivel polimórfico. En cuanto a la He, 2 marcadores resultaron ser poco polimórficos ($He > 0,1$) y 9 probaron ser altamente polimórficos ($He > 0,7$). La He, es la heterocigosidad que se esperaría en condiciones de equilibrio Hardy-Weinberg y cuantifica la cantidad de variación genética debida a *loci* polimórficos (Nei M, 1973). Estos valores fueron determinantes, junto con la frecuencia de alelos nulos para seleccionar el conjunto de marcadores a utilizar en el test de genotipado. Los alelos nulos son ocasionados por la presencia de mutaciones en una de las zonas de unión de los primers, y pueden presentarse en frecuencia elevada en algunos *loci*. Su presencia conlleva al incorrecto genotipado de individuos heterocigotos, considerados erróneamente como homocigotos, siendo ésta una importante fuente de error. En consecuencia, marcadores con altos índices de alelos nulos ($>0,1$) deben ser descartados del análisis o se deben rediseñar sus cebadores. Es por esto que los marcadores Obo46 y OdLAR96 no fueron considerados para formar parte del Test. Sin embargo, como la estimación de alelos nulos se realiza en base a las diferencias entre las frecuencias observadas y esperadas de los individuos homocigotos, está directamente sujeta a la sensibilidad del método utilizado para la asignación de alelos. Es por esto que, los marcadores Obo71 y OdLAR95 se

incluyeron en el diseño de las reacciones multiplex a pesar de que presentan F_{null} encima del número de corte (0,179 y 0,181 respectivamente). Posiblemente, debido a la poca diferencia de tamaño que presentan los alelos de cada marcador, 2 y 3 pb, existan alelos consecutivos en tamaño, que no están pudiendo resolverse mediante la electroforesis en poliacrilamida teñida con sales de plata, generando una subestimación en el número de alelos y sus frecuencias, repercutiendo en la F_{null} . Posteriormente, mediante el análisis por electroforesis capilar, se volverán a estimar los parámetros de diversidad y se confirmará esta información y la utilización de dichos marcadores.

Los parámetros obtenidos, que caracterizan a cada uno de los marcadores presentaron valores similares a los descritos en la literatura. En el caso de los descritos por Koshimizu et al. 2009, denominados Obo, presentaron, en general, un menor número de alelos, esto puede deberse a que se utilizó un tamaño muestral menor, y sobre todo al hecho de que, dichos marcadores fueron estandarizados en un grupo de 25 individuos compuesto por ejemplares provenientes de 3 sitios distintos de muestreo, donde 9 de ellos provienen de la Laguna Chascomús. Esto sin dudas influye en la diversidad de alelos detectados, ya que distintas poblaciones pueden presentar alelos diferentes o con distintas frecuencia de aparición. En el

caso del locus Odont02 (Beheregaray y Sunnucks 2000), también se obtuvo un menor número de alelos, en este caso su caracterización se realizó en *O. argentinensis* y con un extenso tamaño muestral (N=204). De esta forma pudieron detectar alelos muy raros y poco frecuentes (nuevas mutaciones), sin embargo estos no son informativos para evaluar la diversidad genética, es más importante una precisa detección de frecuencias de alelos para estimaciones exactas de diversidad. Parece haber pocos beneficios en el muestreo de más de 25 a 30 individuos para estudios genéticos poblacionales basados en frecuencias de alelos de microsatélites. (Hale ML, 2012). En el mismo trabajo, evaluaron la amplificación cruzada entre especies para los mismos marcadores, resultando en un N_a : 7 para un conjunto de 15 individuos en *O. bonariensis*. En el caso del OdLAR95, Villanova (2013) describe la amplificación cruzada de los marcadores entre distintas especies del género *Odontesthes*, la caracterización se realiza en el presente trabajo. En todos los casos se obtuvieron valores de H_e similares, y los rangos de tamaño se mantuvieron dentro del reportado, con la excepción del locus Obo71, que presentó valores por debajo de dicho rango. Para la decisión de con que fluoróforo marcar cada locus, se utilizó el rango de tamaño con valores más extremos, en el Obo71 se consideró el valor experimental como cota inferior. (Tabla 4)

Luego se calcularon los valores P_{exc} acum1 y P_{exc} acum2, potenciales de exclusión acumulados, a medida que se retiraban marcadores del análisis, hasta llegar a un compromiso entre un alto poder de exclusión (mayor al 95%), con el menor costo de reactivos posible, relacionado al número de marcadores a amplificar. Este parámetro resulta de importancia para la aplicación de este Test para estimar grado de parentesco entre dos generaciones consecutivas (análisis de paternidad) o entre dos individuos cualesquiera (análisis de parentesco). El estudio del parentesco existente entre los reproductores disponibles en una estación de cultivo permite diseñar los cruzamientos con el fin de evitar los efectos indeseados de la depresión consanguínea. El aumento en el índice de endogamia o cosanguinidad, repercute negativamente en el cultivo ya que se ha observado que un aumento en este índice se refleja en una disminución del crecimiento, menor sobrevivencia de los alevines y menor capacidad reproductiva. Los análisis de paternidad y parentesco requieren la cuidadosa selección previa de los marcadores más resolutivos, estrechamente relacionado con el polimorfismo, y de mayor potencial de exclusión, siendo función asintótica tendiente a 1 del número de locus utilizados, figura 1. En este caso, alcanzado un poder de exclusión mayor al 95%, el uso de un mayor número de marcadores no aumentaba

significativamente el poder de exclusión para justificar el incremento en los costos de realizar el test con más cebadores.

De esta forma se seleccionaron 7 marcadores que forman parte de las multiplex M1 (Obo02, Obo26, Obo59 y Odont02) y M2 (Obo54, Obo71 y OdLAR95), que presentaron en conjunto un potencial de exclusión acumulado $P_{exc\ acum1}=0,992$. Además, presentaron un promedio de alelos por locus de 9,14, una heterocigosidad esperada promedio de 0,847 y un índice de contenido polimórfico promedio igual a 0,803.

Con el fin de validar las dos reacciones multiplex como base del Test de genotipado, se evaluarán las multiplex M1 y M2 en familias de pejerrey (5 a 10), para verificar la segregación mendeliana e independencia de los marcadores, y la frecuencia de aparición de alelos nulos. También se definirán los parámetros de relación de parentesco entre individuos de relación familiar conocida.

Conclusión

En el presente trabajo se realizó el diseño y caracterización de dos reacciones de PCR multiplex para pejerrey *O. bonariensis*. Dichas reacciones constituyen la base del “Test de genotipado para pejerrey” y se basan en la coamplificación de 7 loci microsatélites. El “Test de genotipado para pejerrey” puede ser aplicado para estudios de análisis de diversidad genética y estructura poblacional y podrá ser utilizado para realizar análisis de

paternidad y parentesco luego de su validación en familias.

Bibliografía

- Arranz SE, Sciara AA, Botta PP, Cerutti P, Tobin M, and GM Somoza (2008). Growth hormone-insuline-like growth factor-I system in pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes). *R. Bras. Zootec.* 37:01-07.
- Barrero, N. L. (2008). Caracterización genética de lotes de peces usados en programas de repoblamiento y su importancia en la conservación genética en la piscicultura. *Zootecnia* 26: 515–522.
- Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry* 196: 80-83.
- Beheregaray LB & Sunnucks P. (2000). Microsatellite loci isolated from *Odontesthes argentinensis* and the *O. perugiae* species group and their use in other South American silverside fish. *Molecular Ecology*, 9 (5), 629-631.
- Chistiakov DA, Hellemans B, Volckaert FA (2006) Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255: 1-29.
- Crook, D.A., W.H. Lowe, F.W. Allendorf, T. Erős, D.S. Finn, B. Gillanders. *et al.* (2015). Human effects on ecological connectivity in aquatic ecosystems: integrating scientific approaches to

- support management and mitigation. *Sci. Total Environ.* 534: 52-64.
- Cruzan, M.B. (2001). Population size and fragmentation thresholds for the maintenance of genetic diversity in the herbaceous endemic *Scutellaria montana* (Lamiaceae). *Evolution*, 55: 1569-1580.
- Guichoux E, Lagache L, Wagner S, Chaumeil P, Léger P, et al. (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* 11: 591-611.
- Hale ML, Burg TM, Steeves TE (2012) Sampling for microsatellite-based population genetic studies: 25 to 30 individuals per population is enough to accurately estimate allele frequencies. *PloS one* 7: e45170.
- Karaiskou N, Primmer C. (2008) PCR multiplexing for maximising genetic analyses with limited DNA samples: an example in the collared flycatcher, *Ficedula albicollis*. *JSTOR*. pp. 478-482.
- Koshimizu E, Strüssmann CA, Tejedor ED, Okamoto N, Fukuda H & Sakamoto T (2009). Development of polymorphic microsatellite loci for two Atherinopsid fishes, pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) and Patagonian pejerrey (*O. hatcheri*). *Mol Ecol Resour*, 9, 1460-1466.
- Miranda LA, GE Berasain, CA Velasco, Y Shirojo and GM Somoza (2006). Natural spawning and intensive culture of pejerrey *Odontesthes bonariensis* juveniles. *Biocell* . 30:157-162.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70: 3321-3323.
- Olden, J.D., N.L. Poff, M.R. Douglas, M.E. Douglas & K.D. Fausch (2004). Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. *Trends Ecol. Evol.*, 19: 18-24.
- Valencia, E., Veliz, D., Tombari, A. & Vega, C. (2017). Genetic population structure and evidence of genetic homogeneity in populations of the Argentinian silverside *Odontesthes bonariensis* (Teleostei: Atherinopsidae) inhabiting central and northwestern Argentina. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 45(4): 708-716, 2017.
- Villanova, G. V., M. Vera, J. Díaz, P. Martínez, N. B. Calcaterra & S. E. Arranz (2013). Microsatellite marker characterization for the pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, using 454-Roche pyrosequencing technology. *Molecular Ecology Resources* 13: 546–549.
- Villanova, Gabriela Vanina et al. Species assignment and population genetic studies of Gran Paraná pejerrey (*Odontesthes* sp., Atheriniformes, Atherinopsidae) from La Plata Basin in South America. *Hydrobiologia* 819 (2018): 243-257.